

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 avril 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/28428 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

A61K 39/21

(74) Mandataires : KERNEIS, Danièle etc.; Aventis Pasteur,
Direction de la Propriété Intellectuelle, 2, avenue Pont Pas-
teur, F-69007 Lyon (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/03098

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(22) Date de dépôt international : 8 octobre 2001 (08.10.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

00/12808

6 octobre 2000 (06.10.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : AVEN-
TIS PASTEUR [FR/FR]; 2, avenue Pont Pasteur, F-69367
Lyon (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :
HAENSLER, Jean [FR/FR]; 17, rue Piccandet, F-69290
Saint Genis les Ollières (FR). HURPIN, Christian,
Marcel [FR/FR]; 18, chemin de la Ferlatière, F-69280 St
Didier au Mont d'Or (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: VACCINE COMPOSITION

(54) Titre : COMPOSITION VACCINALE

(57) Abstract: The invention concerns a vaccine composition comprising at least an antigen, a cationic lipid and an immunostimulatory oligonucleotide. Said vaccine composition is particularly designed to induce an immune response of the Th1 type and a cytotoxic T response when administered by parenteral delivery, and to induce a Th2 type immune response when delivered through the mucous system. Said composition is of particular interest when the cationic lipid is DC chol.

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition vaccinale comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un oligonucléotide immunostimulant. Cette composition vaccinale est particulièrement destinée à l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1 et d'une réponse T cytotoxique lors de son administration par voie parentérale, et à l'induction d'une réponse immunitaire de type Th2 lors de son administration par voie muqueuse. Cette composition vaccinale est d'un intérêt particulier lorsque le lipide cationique est du DCchol.

WO 02/28428 A2

COMPOSITION VACCINALE

L'invention est relative au domaine des compositions vaccinales. Plus particulièrement,
5 l'invention concerne une composition vaccinale adjuvée.

On connaît dans l'art antérieur de nombreux adjuvants susceptibles d'être utilisés dans le domaine des vaccins afin d'améliorer la réponse immunitaire induite lors de leur administration. Ainsi, par exemple, la demande de brevet WO96/14831 décrit l'utilisation d'adjuvants
10 constitués par des composés amphipathiques comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique, tels que le 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl] cholestérol, encore appelé DC chol.

La demande de brevet WO98/18810, quant à elle, décrit des nucléotides dont la séquence nucléotidique possède des motifs particuliers (un dinucléotide CG encadré par l'Adénine, la
15 Guanine ou la Thymine d'un côté et la Cytosine ou la Thymine de l'autre côté), pour leur utilisation en tant qu'immunostimulants, notamment lors de l'administration de vaccins.

Ces demandes ne sont que des exemples parmi l'importante littérature relative à ce sujet.

Or, bien que de nombreuses substances aient été décrites dans l'art antérieur en relation avec leurs propriétés d'adjuvants vaccinaux, on cherche toujours à améliorer la qualité et l'efficacité
20 des vaccins grâce, notamment, à l'utilisation de nouveaux adjuvants qui permettraient, soit de diminuer la quantité d'antigènes présents dans le vaccin pour obtenir une réponse immunitaire satisfaisante, soit d'orienter la réponse immunitaire dans la direction souhaitée en fonction, par exemple, de la maladie concernée, de la voie d'administration choisie ou de l'effet recherché (prévention ou traitement).

25 Une des difficultés est liée au fait que, même si les réponses du système immunitaire sont de mieux en mieux connues, il reste très difficile, voire impossible, de les anticiper, et que très souvent, la combinaison de 2 adjuvants conduit à un résultat décevant, soit parce que la toxicité est alors trop grande, soit parce que chacun des adjuvants, actif isolément, semble avoir un effet inhibiteur ou neutralisant sur l'adjuvant qui lui est associé.

30 Le but de la présente invention est donc de proposer une nouvelle composition vaccinale dont l'immunogénicité est améliorée par rapport à l'art antérieur, i.e. que la réponse immunitaire induite consécutivement à son administration est augmentée par rapport à l'art antérieur.

- 2 -

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet une composition vaccinale comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un oligonucléotide immunostimulant.

En effet, on a remarqué, de façon inattendue, qu'il y avait une synergie dans l'action adjuvante de ces 2 substances (le lipide cationique et l'oligonucléotide immunostimulant) vis-à-vis d'un
5 antigène, lorsqu'elles étaient administrées simultanément.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire spécifique de type Th1, lorsque cette composition est administrée par voie
10 parentérale.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une forte réponse cytotoxique, en particulier une réponse T cytotoxique, lorsque cette composition
15 est administrée par voie parentérale.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire spécifique de type Th2, lorsque cette composition est administrée par voie
20 muqueuse.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une forte production d'anticorps IgA spécifiques dudit antigène, lorsque cette
25 composition est administrée par voie muqueuse.

Selon une caractéristique de l'invention, ledit lipide cationique est du DCchol.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, ledit antigène est un antigène du virus de
30 la grippe ou un antigène du virus VIH.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre.

Par composition vaccinale au sens de la présente invention, on entend une composition susceptible d'être administrée à l'homme ou à l'animal afin d'induire une réponse du système immunitaire; cette réponse du système immunitaire pouvant se traduire par une production
5 d'anticorps ou simplement, par une activation de certaines cellules, notamment les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T, les lymphocytes B. La composition vaccinale peut être une composition à visée prophylactique ou à visée thérapeutique, ou encore les deux.

La composition vaccinale peut être administrée par toutes les voies habituellement utilisées en
10 vaccination; elle présente, cependant, des caractéristiques particulières selon la voie d'administration, dans la mesure où elle induit des réponses immunitaires spécifiques distinctes. Ceci est particulièrement avantageux si l'on désire orienter la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène particulier.

Par exemple, dans le cas des microorganismes ayant une porte d'entrée muqueuse, il peut être
15 intéressant d'induire une réponse immunitaire de type muqueuse, avec production d'immunoglobulines A spécifiques.

Ainsi, il peut être intéressant de rechercher ce type de réponse dans la vaccination contre les virus à porte d'entrée respiratoire (Virus Syncytial Respiratoire, virus de la grippe, parainfluenza virus, etc...), à porte d'entrée digestive (virus de la polio, rotavirus,...) ou encore à porte
20 d'entrée vaginale ou rectale (VIH, hépatite B,....)

De la même façon, une réponse immunitaire de type muqueux est recherchée dans les affections bactériennes provoquées par exemple par Chlamydia, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis.

Par contre, dans d'autres cas, on souhaite plutôt induire une réponse de type TH1 avec
25 production de cellules cytotoxiques; ceci est notamment le cas pour les virus non cytopathiques tels que les cytomegalovirus, les microorganismes intracellulaires (Bacille de Koch, des parasites comme Falciparum ou Leishmania, des bactéries telles que Listeria, Legionella, Yersinia enterocolitica) ou d'autres comme les Spirochètes.

Dans certains cas encore, on peut souhaiter induire plusieurs types de réponse; c'est
30 notamment le cas pour la grippe ou le Sida. Dans de tels cas, la composition selon l'invention est d'un intérêt tout particulier, car elle permet, alors, d'obtenir différents types de réponse du système immunitaire.

- 5 -

d'oligoribonucléotide, ou d'oligodesoxyribonucléotide. On utilise notamment des oligonucléotides comprenant au moins une séquence dinucléotidique Cytosine, Guanine, dans laquelle ni la Cytosine ni la Guanine ne sont méthylées. Tout autre oligonucléotide connu pour être, par sa nature même, immunostimulant, peut également convenir aux fins de l'invention.

- 5 On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant un oligonucléotide dont la séquence est décrite dans la demande de brevet WO96/02555 sous SEQ ID N° 15, qui est reprise ci-après: 5' GAGAACGCTCGACCTTCGAT 3'.

Les oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester, ou sous toute autre forme étudiée afin de les améliorer, notamment en terme
10 de stabilité; ainsi, il est possible d'utiliser des oligonucléotides se présentant sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester/phosphorothioates. Bien qu'il soit possible d'utiliser des oligonucléotides provenant de sources d'acides nucléiques existantes tel que l'ADN génomique ou le cADN, on préfère utiliser des oligonucléotides de synthèse. Ainsi, il est possible d'élaborer des oligonucléotides sur support solide en utilisant la méthode β -cyano
15 éthyl phosphoramidite (Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H. Tetrahedron Letters 22, 1859 - 1862 (1981)) pour l'assemblage 3'-5'.

Les oligonucléotides phosphorothioatés ont un des atomes d'Oxygène composant le groupement Phosphate qui est remplacé par un atome de Soufre. Leur synthèse peut être effectuée comme précédemment décrit, sauf à remplacer la solution iode/eau/pyridine
20 tétrahydrofurane qui est utilisée lors de l'étape d'oxydation nécessaire à la synthèse des liaisons phosphodiester par une solution TETD (tétraéthylthiuram disulfide) apportant les ions sulfates permettant de produire le groupement phosphorothioate.

On peut également envisager d'autres modifications des liaisons phosphodiesters, des bases ou des sucres, pour modifier les propriétés des oligonucléotides utilisés, et notamment pour
25 accroître leur stabilité.

Par réponse immunitaire de type Th1 au sens de la présente invention, on entend une réponse immunitaire spécifique de l'antigène caractérisée en ce qu'elle entraîne une production orientée de cytokines, principalement l'Interféron γ et l'IL2, et une production massive de certaines
30 sous-classes d'anticorps (i.e. IgG2a chez la souris).

On peut également observer une production de cellules T cytotoxiques.

- 2 -

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet une composition vaccinale comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un oligonucléotide immunostimulant.

En effet, on a remarqué, de façon inattendue, qu'il y avait une synergie dans l'action adjuvante de ces 2 substances (le lipide cationique et l'oligonucléotide immunostimulant) vis-à-vis d'un
5 antigène, lorsqu'elles étaient administrées simultanément.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire spécifique de type Th1, lorsque cette composition est administrée par voie
10 parentérale.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une forte réponse cytotoxique, en particulier une réponse T cytotoxique, lorsque cette composition
15 est administrée par voie parentérale.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire spécifique de type Th2, lorsque cette composition est administrée par voie
20 muqueuse.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une forte production d'anticorps IgA spécifiques dudit antigène, lorsque cette
25 composition est administrée par voie muqueuse.

Selon une caractéristique de l'invention, ledit lipide cationique est du DCchol.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, ledit antigène est un antigène du virus de
30 la grippe ou un antigène du virus VIH.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre.

Par composition vaccinale au sens de la présente invention, on entend une composition susceptible d'être administrée à l'homme ou à l'animal afin d'induire une réponse du système immunitaire; cette réponse du système immunitaire pouvant se traduire par une production
5 d'anticorps ou simplement, par une activation de certaines cellules, notamment les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T, les lymphocytes B. La composition vaccinale peut être une composition à visée prophylactique ou à visée thérapeutique, ou encore les deux.

La composition vaccinale peut être administrée par toutes les voies habituellement utilisées en
10 vaccination; elle présente, cependant, des caractéristiques particulières selon la voie d'administration, dans la mesure où elle induit des réponses immunitaires spécifiques distinctes. Ceci est particulièrement avantageux si l'on désire orienter la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène particulier.

Par exemple, dans le cas des microorganismes ayant une porte d'entrée muqueuse, il peut être
15 intéressant d'induire une réponse immunitaire de type muqueuse, avec production d'immunoglobulines A spécifiques.

Ainsi, il peut être intéressant de rechercher ce type de réponse dans la vaccination contre les virus à porte d'entrée respiratoire (Virus Syncytial Respiratoire, virus de la grippe, parainfluenza virus, etc...), à porte d'entrée digestive (virus de la polio, rotavirus,...) ou encore à porte
20 d'entrée vaginale ou rectale (VIH, hépatite B,....)

De la même façon, une réponse immunitaire de type muqueux est recherchée dans les affections bactériennes provoquées par exemple par Chlamydia, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis.

Par contre, dans d'autres cas, on souhaite plutôt induire une réponse de type TH1 avec
25 production de cellules cytotoxiques; ceci est notamment le cas pour les virus non cytopathiques tels que les cytomegalovirus, les microorganismes intracellulaires (Bacille de Koch, des parasites comme Falciparum ou Leishmania, des bactéries telles que Listeria, Legionella, Yersinia enterocolitica) ou d'autres comme les Spirochètes.

Dans certains cas encore, on peut souhaiter induire plusieurs types de réponse; c'est
30 notamment le cas pour la grippe ou le Sida. Dans de tels cas, la composition selon l'invention est d'un intérêt tout particulier, car elle permet, alors, d'obtenir différents types de réponse du système immunitaire.

Par antigène au sens de la présente invention, on entend tout antigène susceptible d'être utilisé dans un vaccin, qu'il s'agisse de germe entier ou de sous-unité et quelle que soit sa nature: peptide, protéine, glycoprotéine, polysaccharide, glycolipide, lipopeptide...etc. Il peut s'agir d'antigènes viraux, bactériens ou autres; le terme antigène comprend également les polynucléotides dont les séquences sont choisies pour coder les antigènes que l'on souhaite voir exprimés par les individus auxquels sont administrés les polynucléotides, dans le cas de la technique d'immunisation que l'on appelle immunisation ADN. Il peut également s'agir d'un ensemble d'antigènes, notamment dans le cas d'une composition vaccinale multivalente qui comprend des antigènes susceptibles de protéger contre plusieurs maladies, ou dans le cas d'une composition qui comprend plusieurs antigènes différents pour protéger contre une seule maladie, ainsi que cela est le cas pour certains vaccins contre la coqueluche ou la grippe par exemple.

Par lipide cationique au sens de la présente invention, on entend un composé formé d'une partie grasse (par exemple une ou plusieurs chaînes hydrophobes ou un noyau stérol) et d'une tête polaire chargée positivement au pH physiologique. En particulier, il peut s'agir d'un composé comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique et notamment un dérivé de cholestérol relié à un ammonium quaternaire ou à une amine protonable par une liaison carbamoyle. Une telle liaison présente en effet l'avantage d'être hydrolysable dans la cellule. De tels composés peuvent se trouver sous forme basique, sous forme de sel, ou encore, et c'est le cas le plus fréquent, à la fois sous les 2 formes en équilibre dans un mélange, le déplacement de l'équilibre vers l'une ou l'autre forme dépendant de la composition du mélange et notamment de son pH. Un des lipides cationiques particulièrement intéressant aux fins de l'invention est le DCchol qui peut être obtenu à partir de cholesteryl chloroformate et de N, N-diméthylethylenediamine, selon la méthode décrite dans le brevet US 5283185 ou de façon préférée, selon la méthode décrite à l'exemple 8 de la demande de brevet WO 96/40067. Il est possible également d'utiliser un produit obtenu par réaction de cholestéryl chloroformate et de N,N,N triméthyléthylènediamine.

30

Par oligonucléotide au sens de la présente invention, on comprend un oligonucléotide simple brin ayant de 6 à 100 nucléotides, de préférence de 6 à 30 nucléotides. Il peut s'agir

- 5 -

d'oligoribonucléotide, ou d'oligodesoxyribonucléotide. On utilise notamment des oligonucléotides comprenant au moins une séquence dinucléotidique Cytosine, Guanine, dans laquelle ni la Cytosine ni la Guanine ne sont méthylées. Tout autre oligonucléotide connu pour être, par sa nature même, immunostimulant, peut également convenir aux fins de l'invention.

- 5 On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant un oligonucléotide dont la séquence est décrite dans la demande de brevet WO96/02555 sous SEQ ID N° 15, qui est reprise ci-après: 5' GAGAACGCTCGACCTTCGAT 3'.

Les oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester, ou sous toute autre forme étudiée afin de les améliorer, notamment en terme
10 de stabilité; ainsi, il est possible d'utiliser des oligonucléotides se présentant sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester/phosphorothioates. Bien qu'il soit possible d'utiliser des oligonucléotides provenant de sources d'acides nucléiques existantes tel que l'ADN génomique ou le cADN, on préfère utiliser des oligonucléotides de synthèse. Ainsi, il est possible d'élaborer des oligonucléotides sur support solide en utilisant la méthode β -cyano
15 éthyl phosphoramidite (Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H. Tetrahedron Letters 22, 1859 - 1862 (1981)) pour l'assemblage 3'-5'.

Les oligonucléotides phosphorothioatés ont un des atomes d'Oxygène composant le groupement Phosphate qui est remplacé par un atome de Soufre. Leur synthèse peut être effectuée comme précédemment décrit, sauf à remplacer la solution iode/eau/pyridine
20 tétrahydrofurane qui est utilisée lors de l'étape d'oxydation nécessaire à la synthèse des liaisons phosphodiester par une solution TETD (tétraethylthiuram disulfide) apportant les ions sulfates permettant de produire le groupement phosphorothioate.

On peut également envisager d'autres modifications des liaisons phosphodiesters, des bases ou des sucres, pour modifier les propriétés des oligonucléotides utilisés, et notamment pour
25 accroître leur stabilité.

Par réponse immunitaire de type Th1 au sens de la présente invention, on entend une réponse immunitaire spécifique de l'antigène caractérisée en ce qu'elle entraîne une production orientée de cytokines, principalement l'Interféron γ et l'IL2, et une production massive de certaines
30 sous-classes d'anticorps (i.e. IgG2a chez la souris).

On peut également observer une production de cellules T cytotoxiques.

- 6 -

Par réponse immunitaire de type Th2, on entend une réponse immunitaire qui se traduit par une production majoritaire d'IL4 et d'IL5, ainsi que par une production massive de certaines autres sous-classes d'anticorps (i.e IgG1 chez la souris).

- 5 Lorsqu'on veut étudier le type de réponse immunitaire induite par une composition vaccinale, on peut effectuer des dosages comparatifs des IgG1 et des IgG2a spécifiques produites lors de l'administration de la composition vaccinale étudiée à des souris; une réponse de type Th1 se traduit par une plus forte production d' IgG2a spécifiques conduisant à une valeur faible du rapport IgG1/ IgG2a, alors qu'une réponse de type Th2 se traduit par une plus forte production
- 10 d' IgG1 spécifiques conduisant à une valeur forte du rapport IgG1/IgG2a.

Alternativement, le dosage des cytokines produites permet également, lors de tests in vitro ou sur animaux, d'apprécier l'orientation de la réponse immunitaire; on peut notamment effectuer le rapport IL5/INF γ ; une réponse de type Th1 se traduisant par une valeur faible de ce rapport alors qu'une réponse de type Th2 se traduit plutôt par une valeur élevée de ce rapport.

- 15 Il est également possible d'observer la quantité d' IgA dont la production traduit une orientation de la réponse immunitaire vers le type Th2.

Or, selon les cibles vaccinales, i.e. les maladies contre lesquelles sont destinées les compositions vaccinales, il peut être souhaitable de pouvoir orienter la réponse immunitaire.

20

Les exemples qui suivent illustrent, de façon non limitative, des modes de réalisation de l'invention.

Exemple 1

- 5 On a utilisé du chorhydrate de DC-Chol (obtenu selon le mode de préparation décrit à l'exemple 8 de la demande de brevet WO 96/40067) que l'on a mis en suspension à 20 mg/ml dans du tampon TRIS-NaCl (20 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 6.8). Après 8 heures sous agitation à 35-40°C sous argon, la suspension a été microfluidisée à l'aide d'un microfluidiseur M-110S de chez Microfluidics (10 cycles à 500 kPa), afin de générer une suspension
- 10 homogène de DC-Chol, que l'on a filtrée sur un filtre Millex 0.45 µm .

Exemple 2

- On a préparé des oligonucléotides grâce à un automate synthétiseur fourni par Applied Biosystems qui met en œuvre la méthode chimique standard au phosphoramidite et qui
- 15 comporte à chaque cycle une étape d'oxydation.

Cette étape d'oxydation a été réalisée au moyen d'une solution iode/eau/tétrahydrofurane/acétonitrile pour obtenir une liaison phosphodiester et au moyen d'une solution tétraéthylthiuram/acétonitrile pour obtenir une liaison phosphorothioate.

- 20 On a ainsi préparé un oligonucléotide 3 Db(S) dont la séquence est reproduite dans la demande de brevet WO96/02555 sous SEQ ID NO 15 et qui comporte des liaisons phosphorothioate sur toute sa longueur.

- On a préparé également un oligonucléotide MGC (S) dont la séquence est reproduite dans la demande de brevet WO00/15256 à SEQ ID NO 2, qui comporte à la fois des liaisons
- 25 phosphodiester et des liaisons phosphorothioate. Les liaisons phosphorothioate sont situées à chaque extrémité ; il y a 2 liaisons phosphorothioate en 3' et 5 liaisons phosphorothioate en 5'. Cet oligonucléotide ne possède pas de séquence CG et est utilisé comme contrôle négatif.

Exemple 3

On a préparé des doses de 0,2ml de compositions vaccinales contre la grippe ayant une des formulations suivantes:

- 5 - du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de HA seul,
- du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de HA + 200µg de DCchol préparé à l'exemple 1,
- du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de
- 10 HA + 50µg d'oligonucléotide 3Db(S) préparé à l'exemple 2,
- du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de HA + 200µg de DCchol préparé à l'exemple 1 + 50µg d'oligonucléotide 3Db(S) préparé à l'exemple 2

- 15 On a administré les doses préparées à 4 groupes de 6 souris Balb/c, par injection péritonéale, à raison d'une 1^{ère} injection à J0 et d'une injection de rappel à J21.

Pour effectuer le dosage des anticorps produits par la technique ELISA, on a effectué à J35, sur chacune des souris, des prélèvements sanguins. Les résultats de dosage obtenus sont

20 reproduits dans le Tableau 1 ci-après, où les titres indiqués sont des moyennes des titres obtenus par ELISA sur chacune des 6 souris appartenant à chaque groupe.

	IgG1	IgG2a	IgG1/IgG2a
5µg HA	20401	4930	9,1
5µg HA+ DCchol 200µg	127743	10082	12,7
5µg HA+ 3Db(S) 50µg	27243	15863	1,7
5µg HA+ DCchol 200µg + 3Db(S) 50µg	122956	87761	1,4

Ces résultats illustrent la synergie obtenue entre les 2 adjuvants présents dans la composition vaccinale selon l'invention, en ce qui concerne la production d'anticorps IgG2a. En effet, la

25 quantité d'anticorps IgG2a produits après administration d'une composition vaccinale selon

- 9 -

l'invention est bien supérieure à la somme des quantités produites après administration des compositions vaccinales comprenant un seul des adjuvants de l'art antérieur.

Pour étudier la réponse cytotoxique induite, on a prélevé à J35 les cellules spléniques des
5 souris de chacun des groupes.

Les cellules, dont on voulait mesurer l'activité cytotoxique spécifique vis-à-vis de cellules-cibles présentant un épitope dominant MHC classe I restreint de l'hémagglutinine, ont été restimulées in vitro en présence de cellules stimulantes syngéniques (issues de souris non immunisées) infectées par le virus de la souche A/Singapore/6/86 (H1N1).

10 Leur fonction cytotoxique a été mise en évidence en utilisant comme cellules-cibles des cellules de la lignée P815 sensibilisées par un peptide épitope de l'hémagglutinine du virus de la souche A/Singapore/6/86 (H1N1).

La lyse des cellules-cibles a été mesurée par une technique radioactive basée sur le chargement des cellules-cibles en chrome radioactif Cr-51 et sur le relargage de ce radioélément lors de la
15 lyse cellulaire.

Pour chacune des compositions vaccinales testées, les cellules cytotoxiques ont été mises en contact avec les cellules cibles dans les proportions suivantes: 100 cellules cytotoxiques pour 1 cellule-cible et 33 cellules cytotoxiques pour 1 cellule-cible.

Pour chaque valeur 100 ou 33 du ratio cellules cytotoxiques/ cellule-cible, on a effectué:

- 20
- le dosage du chrome libéré spontanément sans ajout de cellules cytotoxiques,
 - le dosage du chrome libéré après lyse totale des cellules-cibles,
 - ainsi que le dosage du chrome libéré après action des cellules dont on veut mesurer l'activité cytotoxique.

Puis on a calculé le pourcentage de cytotoxicité, de la façon suivante:

25

$$\frac{100 \times (\text{libération cellules cytotoxiques} - \text{libération spontanée})}{(\text{libération totale} - \text{libération spontanée})}$$

Les résultats obtenus sont exprimés dans le Tableau 2 suivant:

30

Tableau 2

	100/1	30/1
5µg HA	43	28
5µg HA+ DCchol 200µg	25	17
5µg HA+ 3Db(S) 50µg	49	19
5µg HA+ DCchol 200µg + 3Db(S) 50µg	71	46

- 5 Ces résultats montrent que la réponse cellulaire appréciée par l'induction de cellules cytotoxiques est également accrue lors de l'utilisation d'une composition vaccinale selon l'invention.

Les résultats obtenus dans un test analogue avec des cellules-cibles non sensibilisées
 10 conduisent aux résultats suivants exprimés dans le Tableau 3 ci-après:

Tableau 3

	100/1	30/1
5µg HA	7	4
5µg HA+ DCchol 200µg	7	4
5µg HA+ 3Db(S) 50µg	10	9
5µg HA+ DCchol 200µg + 3Db(S) 50µg	8	4

- 15 Ces résultats indiquent que la réponse cytotoxique induite est une réponse des cellules cytotoxiques T CD8+.

Si l'on considère l'ensemble des résultats obtenus, on remarque que l'objet de la présente
 20 invention permet d'orienter la réponse anticorps spécifiques vers une réponse immunitaire de type Th1 avec une diminution très sensible du rapport IgG1/IgG2a, tout en maintenant le niveau de production des IgG1 spécifiques équivalent à celui obtenu lorsque la composition vaccinale ne comprend qu'un seul adjuvant constitué par du DCchol. Cette orientation de la

- 11 -

réponse en anticorps est en outre avantageusement associée à une induction de cellules cytotoxiques, et notamment de cellules T CD8+.

Exemple 4

5

On a préparé, comme à l'exemple 3, des doses de 0,2ml de compositions vaccinales contre la grippe ayant une des formulations suivantes:

- du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de HA seul,
- 10 - du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de HA + 200µg de DChol préparé à l'exemple 1,
- du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de HA + 5µg d'oligonucléotide 3Db(S) préparé à l'exemple 2,
- du vaccin grippe monovalent souche A/Singapore/6/86 (H1N1) correspondant à 5µg de
- 15 HA + 200µg de DChol préparé à l'exemple 1 + 5µg d'oligonucléotide 3Db(S) préparé à l'exemple 2.

On a injecté à des souris réparties en 4 groupes de 6, en sous-cutané cette fois, une dose de chacune des compositions vaccinales (1 groupe de 6 souris par formulation vaccinale) à J0 et à J21. Les sérums ont été prélevés et dosés de la même façon que dans l'expérience précédente.

- 20 Les résultats obtenus relativement aux dosages des anticorps produits sont récapitulés dans le Tableau 4 ci-après:

	IgG1	IgG2a	IgG1/IgG2a
5µg HA	6882	585	11,8
5µg HA+ DCchol 200µg	108211	20443	5,3
5µg HA+ 3Db(S) 5µg	4519	384	11,8
5µg HA+ DCchol 200µg + 3Db(S) 5µg	133544	59545	2,2

- 25 Les tests de cytotoxicité ont montré, de la même façon qu'à l'exemple 3, qu'avec une composition selon l'invention, on induisait des cellules cytotoxiques, et notamment des cellules T CD8+.

- 12 -

En outre, des dosages d'Interféron γ ont montré qu'il y avait une induction importante de la production de cette cytokine.

Ces résultats montrent, de la même façon qu'à l'exemple 3, qu'il y a une synergie entre l'effet
5 des 2 adjuvants, notamment en ce qui concerne la réponse en IgG2a, même lorsque la quantité d'oligonucléotide est réduite à une valeur à laquelle son effet adjuvant n'était pas détectable.

Contrairement à ce qui est observé habituellement, on constate en outre, qu'il n'y a aucun effet inhibiteur de l'un des adjuvants sur l'action de l'autre, lorsqu'on utilise une composition selon l'invention.

10

Exemple 5

On a préparé des compositions vaccinales contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans lesquelles l'antigène est la glycoprotéine d'enveloppe gp160 MN/LAI-2.

15 Cet antigène contient la portion gp120 de l'isolat VIH-1 MN et la portion gp41 de l'isolat VIH-1 LAI. La gp41 a été délétée de son site de clivage avec la gp120 et de sa partie transmembranaire de façon à obtenir une glycoprotéine non clivée et essentiellement sécrétée. L'antigène est produit à partir de la lignée cellulaire de hamster BHK-21 infectée par le virus recombinant de la vaccine VVTG.9150 dérivé de la précédente construction VVTG.1163
20 (Kieny, M.-P. et al, 1988, Protein Eng, 2(3) : 219-255), puis est purifié par chromatographie d'échange d'ions suivie d'une chromatographie d'immunoaffinité.

Les doses vaccinales de 20 μ l répondaient à l'une des formulations suivantes:

- 25 μ g de gp160 uniquement,
- 25 - 25 μ g de gp160 + 50 μ g d'oligonucléotide 3Db(S) préparé à l'exemple 2,
- 25 μ g de gp160 + 50 μ g d'oligonucléotide MGC préparé à l'exemple 2 + 200 μ g de DCchol préparé à l'exemple 1,
- 25 μ g de gp160 + 50 μ g d'oligonucléotide 3Db(S) préparé à l'exemple 2 + 200 μ g de DCchol préparé à l'exemple 1.

30 On a injecté les doses vaccinales préparées à 4 groupes de 6 souris (1 formulation par groupe) par voie rectale, sous anesthésie, à raison de 4 injections séparées chacune de 2 semaines (soient J1, J15, J29 et J44).

- 13 -

A J57, on a prélevé du sérum, on a recueilli les fécès et on a procédé à des lavages rectaux afin d'effectuer les dosages suivants:

- dosage par ELISA des IgG anti-gp 160 dans le sérum,
- dosage par ELISA des IgA et des IgG totales ainsi que des IgA et des IgG spécifiques anti-gp160 dans les lavages rectaux,
- dosage par ELISA des IgA et des IgG totales ainsi que des IgA et des IgG spécifiques anti-gp160 dans les fécès.

La composition vaccinale contenant l'oligonucléotide MGC a été considérée comme un contrôle négatif par rapport à l'oligonucléotide 3Db(S). En effet, l'oligonucléotide MGC s'était révélé ne pas être immunostimulant dans des expériences précédentes.

Les résultats obtenus sont récapitulés dans les tableaux ci-après; seules les moyennes par groupe de souris ayant reçu la même composition vaccinale sont indiquées.

Tableau 5: Dosage des IgG spécifiques dans le sérum:

	IgG anti-gp 160 en µg/ml
25 µg gp160	60,55
25 µg gp160 + 50 µg 3Db(S)	46,97
25 µg gp160 + DCchol 200µg + 50µg MGC	47,85
25 µg gp160 + DCchol 200µg +50µg 3Db(S)	645,26

Ces résultats montrent la synergie exercée par les 2 adjuvants pour la production d'IgG vis-à-vis de l'antigène gp160, lors d'une administration par voie muqueuse.

Tableau 6: Dosage des IgA et des IgG dans les lavages rectaux:

	IgA spéc./IgA tot. en %	IgG spéc./IgG tot. en %
25 µg gp160	0,15	3,68
25 µg gp160 + 50 µg 3Db(S)	0,91	2,46
25 µg gp160 + DCchol 200µg + 50µg MGC	0,68	1,07
25 µg gp160 + DCchol 200µg +50µg 3Db(S)	1,53	12,43

5 Tableau 7: Dosage des IgA et des IgG dans les fèces:

	IgA spéc./IgA tot. x 10 ⁴	IgG spéc./IgG tot. en %
25 µg gp160	2,44	0,00
25 µg gp160 + 50 µg 3Db(S)	18,05	1,33
25 µg gp160 + DCchol 200µg + 50µg MGC	43,38	0,00
25 µg gp160 + DCchol 200µg +50µg 3Db(S)	104,79	3,03

Ces résultats montrent l'effet synergique obtenu grâce à l'objet de la présente invention, vis-à-vis de la production locale d'immunoglobulines G et d'immunoglobulines A spécifiques.

10

Cette capacité à stimuler localement la production d'IgA spécifiques est particulièrement recherchée dans certaines applications vaccinales, et confirme l'intérêt de l'objet de la présente invention.

REVENDICATIONS

1. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un
5 oligonucléotide immunostimulant.
2. Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit lipide
cationique est du DCchol.
- 10 3. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que
ledit antigène est un antigène du virus influenza.
4. Composition vaccinale selon une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que ledit
antigène est un antigène du virus VIH.
15
5. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle
est destinée à une administration muqueuse.
6. Composition vaccinale selon une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est
20 destinée à une administration parentérale.
7. Utilisation d'une composition comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un
oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire
de type Th1 lors de son administration par voie parentérale.
25
8. Utilisation d'une composition comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un
oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une forte production
d'anticorps IgA spécifiques dudit antigène lors de son administration par voie muqueuse.
- 30 9. Utilisation d'une composition comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un
oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire T
cytotoxique lors de son administration par voie parentérale.

- 16 -

10. Utilisation d'une composition comprenant au moins un antigène, un lipide cationique et un oligonucléotide pour la fabrication d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire de type Th2 lors de son administration par voie muqueuse.
- 5
11. Utilisation selon une des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que ledit lipide cationique est du DCchol.